

COPY

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 mars 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/16344 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
C12N 15/861, 5/10, 15/34, C07K 14/075, A61K 48/00

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02377

(22) Date de dépôt international: 25 août 2000 (25.08.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/10859 27 août 1999 (27.08.1999) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés, sauf US):
TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim,
F-67000 Strasbourg (FR). EUROPEAN MOLECULAR
BIOLOGY LABORATORY (EMBL) [DE/DE]; Meyer-
hofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): VAN
RAAIJ, Mark, Johan [NL/NL]; Looneind 3-B, NL-5131,

RK Alphen Noord-Brabant (NL). CUSACK, Stephen
[GB/FR]; 653, route de St. Nizier, F-38170 Seyssinet (FR).
LEGRAND, Valérie [FR/FR]; 33, rue de Ribeauvillé,
F-67100 Strasbourg (FR). LEISSNER, Philippe [FR/FR];
8, rue Humann, F-67000 Strasbourg (FR). MEHTALI,
Majid [FR/NL]; Roffart 17, NL- 1083 CJ Amsterdam
(NL).

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AU, CA, JP, US.

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

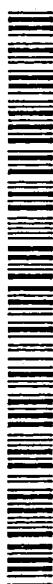
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: MODIFIED ADENOVIRAL FIBRE AND USES THEREOF

(54) Titre: FIBRE ADENOVIRALE MODIFIÉE ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a modified adenoviral fibre comprising at least one mutation at the level of one or several residues included in the region of said fibre extending from layer A to layer B and including the loop AB.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet une fibre d'un adénovirus modifiée comprenant au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus compris dans la région de ladite fibre s'étendant du feuillet A au feuillet B et incluant la boucle AB.



WO 01/16344 A1

FIBRE ADENOVIRALE MODIFIEE ET UTILISATIONS.

La présente invention a notamment pour objet une fibre adénovirale, mutée dans les régions impliquées dans la reconnaissance et la liaison au récepteur cellulaire naturel des adénovirus. Elle concerne également les particules adénovirales portant à leur surface une telle fibre, éventuellement combinée à un ligand qui confère auxdites particules une spécificité d'hôte modifiée, voire ciblée. L'invention présente un intérêt tout particulier dans le cadre de la mise au point de vecteurs utilisables dans le cadre de la thérapie génique.

10 Les vecteurs adénoviraux sont largement utilisés dans de nombreuses applications de thérapie génique. Mis en évidence dans de nombreuses espèces animales, ils sont peu pathogènes, non-intégratifs et se répliquent aussi bien dans les cellules en division que quiescentes. En outre, ils présentent un large spectre d'hôte et sont capables d'infecter un très grand nombre de types cellulaires tels que par exemple
15 les cellules épithéliales, endothéliales, les myocytes, les hépatocytes, les cellules nerveuses et les synoviocytes (Bramson et al., 1995, Curr. Op. Biotech. 6, 590-595).

Le génome adénoviral est constitué d'une molécule d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb contenant deux régions répétées, inversées (désignées ITR pour
20 Inverted Terminal Repeat) encadrant les gènes codant pour les protéines virales. Les gènes précoces sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome adénoviral (E1 à E4 ; E pour early en anglais), comportant 6 unités transcriptionnelles munies de leurs propres promoteurs. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late en anglais) recouvrent en partie les unités de transcription
25 précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais).

Les adénovirus ont fait l'objet de nombreuses études et de nombreuses équipes scientifiques ont développé des vecteurs adénoviraux défectifs pour la réplication, c'est à dire dont le génome a été manipulé de sorte que ces vecteurs adénoviraux
30 soient incapables de se diviser ou de proliférer dans les cellules qu'ils infectent. Les vecteurs adénoviraux défectifs sont notamment obtenus par délétion d'au moins la région E1 (pour des exemples de vecteurs adénoviraux défectifs, voir notamment les demandes de brevet WO9428152 et WO 9412649).

Plus récemment, d'autres utilisations des particules adénovirales ont été décrites,
35 notamment dans le cadre de la mise en œuvre de protocoles de thérapie génique.

Ainsi, la demande de brevet WO 95/21259 décrit une méthode pour introduire un acide nucléique dans une cellule reposant sur la combinaison de particules adénovirales et d'acide nucléique, plus particulièrement d'acide nucléique nu. Cette méthode repose principalement sur la capacité de la particule adénovirale à transporter des molécules jusqu'au noyau cellulaire après endocytose. Curiel et al. (1992 Hum. Gene Ther., 3: 147-154) et Wagner et al. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 6099-6103) ont eux-aussi montré que l'association de plasmide avec des particules adénovirales inactivées permet la lyse de l'endosome avant fusion avec les lysosomes et donc l'échappement du plasmide à la dégradation. Cette astuce permet d'augmenter l'efficacité de transfection du plasmide de 100 à 1000 fois *in vitro*. De façon préférée, afin que la transfection cellulaire soit indépendante du processus adénoviral et passe bien par l'utilisation d'un ligand choisi pour permettre un ciblage de la transfection, un anticorps neutralisant l'infection adénovirale peut être ajouté au complexe (Michael et al., 1993, J. Biol. Chem., 268: 6866-6869). Les contenus de ces publications et demandes de brevet sont incorporés par référence dans la présente demande, dans leur intégralité.

Le cycle infectieux des adénovirus repose sur deux étapes essentielles. La phase précoce précède l'initiation de la réplication et permet de produire les protéines précoces régulant la réplication et la transcription de l'ADN viral. La réplication du génome est suivie de la phase tardive au cours de laquelle sont synthétisées les protéines structurales qui constituent la base des particules virales. L'assemblage des nouveaux virions s'effectue dans le noyau. Dans un premier temps, les protéines virales s'assemblent de manière à former des capsides vides de structure icosaédrique dans lesquelles le génome néo formé est encapsidé. Les adénovirus libérés sont susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives.

Au cours de l'infection, la fibre et le penton base de la particule adénovirale présents à la surface des capsides jouent un rôle critique dans l'attachement cellulaire des virions et leur internalisation (Wickham et al., 1993, Cell, 73, 309-319). En premier lieu, l'adénovirus se lie à un récepteur cellulaire (le CAR) présent à la surface des cellules permissives par l'intermédiaire de la fibre sous sa forme trimérique (Philipson et al., 1968, J. Virol. 2, 1064-1075 ; Defer et al., 1990, J. Virol. 64, 3661-3673). La particule virale est ensuite internalisée par endocytose grâce à la liaison du penton base aux intégrines cellulaires $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (Mathias et al., 1994, J. Virol. 68, 6811-6814).

La fibre adénovirale est composée de trois domaines distincts (Chroboczek et al., 1995, Current Top. Microbiol. Immunol. 199, 165-200) :

- (a) à son extrémité N-terminale, se situe la queue, dont la séquence est très conservée d'un sérotype adénoviral à l'autre. Elle interagit avec le penton base et assure l'ancrage de la molécule dans la capsid ;
- (b) au centre, se situe la tige. Il s'agit d'une structure en bâtonnet composée d'un certain nombre de répétitions de feuillets, dont le nombre varie selon les sérotypes considérés ;
- (c) à son extrémité C-terminale, se situe la tête qui présente une structure globulaire sphérique renfermant les signaux de trimérisation (Hong et Engler, 1996, J. Virol. 70, 7071-7078 ; Novelli et Boulanger, 1991, J. Biol. Chem. 266, 9299-9303 ; Novelli et Boulanger, 1991, Virology 185, 365-376) et est responsable de la liaison aux cellules permissives (Henry et al., 1994, J. Virol 68, 5239-5246 ; Louis et al., 1994, J. Virol. 68, 4104-4106).

Plusieurs équipes ont déjà décrit des particules adénovirales pour lesquelles la fibre native a été modifiée de manière à modifier leur tropisme naturel et changer la spécificité de liaison de cette fibre de manière à ce qu'elle reconnaisse un récepteur cellulaire différent.

WO94/10323 décrit des particules adénovirales de type 5 (Ad5) dont la fibre a été mutée de manière à comprendre la séquence d'un fragment d'anticorps spécifique d'un antigène donné (de type scFv) inséré à la fin de l'une des 22 unités répétitives de la tige. Ces mutants ont une spécificité d'infection des particules adénovirales modifiée et sont capables de se fixer à des cellules présentant l'antigène cible.

US 5,543,328 décrit une fibre adénovirale chimère dans laquelle le domaine de la tête est remplacé par la séquence du facteur de nécrose des tumeurs (TNF), ou celle du peptide ApoE, de manière à rediriger la fixation des particules adénovirales modifiées vers les cellules exprimant le récepteur cellulaire du TNF ou le récepteur LDL (low density lipoprotein), respectivement, présent à la surface des cellules hépatiques.

WO95/26412 décrit une fibre modifiée par l'incorporation d'un ligand à l'extrémité C-terminale.

WO96/26281 décrit une fibre chimère obtenue par remplacement d'une partie de la fibre native et, en particulier de la tête, par la partie équivalente d'une fibre adénovirale d'un autre sérotype et, éventuellement, par insertion à l'extrémité C-terminale d'un peptide RGD spécifique de la vitronectine.

En outre, la demande de brevet français FR2758821 (97 01005) a mis en évidence le rôle des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et des modules III de la fibronectine à titre, respectivement, de récepteur primaire et de co-facteur des adénovirus. De manière identique, Tomko et al. (1997, Proc. Natl.

- 5 Acad. Sci 94, 3352-3356) , Bergelson et al. (1997, Science 275, 1320-1323) et Roelvink et al. (1998, J. Virol. 72, 7909-7915) ont décrit un autre récepteur de la fibre de différents sérotypes d'adénovirus. Il s'agit d'une molécule de surface de 46 kDa, le CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor).

- Enfin, Xia et al. (1994, Structure 2, 1259-1270) ont déterminé la structure
10. cristallographique tridimensionnelle de la tête adénovirale. Chaque monomère comporte 8 feuillets β antiparallèles désignés A à D et G à J et 6 boucles majeures de 8 à 55 résidus. Par exemple, la boucle CD relie le feuillet C au feuillet D. On indique que les feuillets mineurs E et F sont considérés comme faisant partie de la boucle DG située entre les feuillets D et G. A titre indicatif, le tableau 1 indique la
15 localisation de ces structures dans la séquence en acides aminés de la fibre d'Ad5 telle que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO: 1), le +1 représentant le résidu Met initiateur. D'une manière générale, les feuillets forment une structure ordonnée et compacte alors que les boucles sont plus flexibles. Ces
20 termes sont classiques dans le domaine de la biochimie des protéines et sont définis dans les ouvrages de base (voir par exemple Stryer, Biochemistry, 2ième édition, Chap 2, p 11 à 39, Ed Freeman et Compagny, San Francisco).

Tableau 1

feuillet β		boucle	
nomenclature	résidus	nomenclature	résidus
A	400 à 403	AB	404 à 418
B	419 à 428	-	-
C	431 à 440	CD	441 à 453
D	454 à 461	DG	462 à 514
G	515 à 521	GH	522 à 528
H	529 à 536	HI	537 à 549
I	550 à 557	IJ	558 à 572
J	573 à 578		

Les quatre feuillets β A, B, C et J constituent les feuillets V dirigés vers la particule virale. Les quatre autres (D, G, H et I) forment les feuillets R, supposés faire face au récepteur cellulaire. Les feuillets V semblent jouer un rôle important dans la trimérisation de la structure alors que les feuillets R seraient impliqués dans l'interaction avec le récepteur.

La présente invention propose de nouveaux mutants de la fibre adénovirale qui permettent notamment l'obtention de particules virales qui présentent les propriétés suivantes :

- 10 (i) la particule adénovirale comprenant ladite fibre mutée ne se fixe pas de manière substantielle aux récepteurs cellulaires naturels, c'est à dire que la spécificité d'hôte de ces particules adénovirales portant la fibre mutée est réduite, voir inhibée, par comparaison à la spécificité d'hôte des particules adénovirales portant la fibre sauvage, c'est à dire non mutée ;
- 15 (ii) lorsque la particule adénovirale comprenant ladite fibre mutée comprend en outre un ligand spécifique d'un anti-ligand, il est possible de conférer à ladite particule modifiée un nouveau tropisme envers un ou plusieurs types cellulaires spécifiques portant à leur surface ledit anti-ligand par comparaison à la particule adénovirale non mutée.
- 20 Par "la fibre mutée ne se fixe pas de manière substantielle aux récepteurs cellulaires naturels" on entend indiquer que la fibre est modifiée de manière à réduire ou abolir sa capacité de liaison au récepteur cellulaire naturel. Une telle propriété peut être vérifiée par l'étude de l'infectivité ou de la liaison cellulaire des particules adénovirales correspondantes en appliquant les techniques de l'art, et
- 25 notamment par des expériences de compétition d'infection du virus portant la fibre modifiée réalisées en présence d'un compétiteur constitué par tout ou partie de la fibre adénovirale sauvage (pour plus de détail relatif à cette technique de mesure, voir la Partie Expérimentale de la présente demande). La perte de la spécificité naturelle peut être également évaluée par des études d'attachement cellulaire
- 30 réalisées en présence de virus marqués (par exemple à la ^3H thymidine selon la technique de Roelvink et al., 1996, J. Virol. 70, 7614-7621) ou par des études d'infectivité de cellules permissives ou exprimant la molécule de surface ciblée par le ligand (voir les exemples qui suivent). Avantageusement, "une fibre mutée ne se fixe pas de manière substantielle aux récepteurs cellulaires naturels" lorsque le
- 35 pourcentage d'infection résiduelle, mesurée par une expérience de compétition

telle que divulguée dans les Exemples qui suivent, est compris entre environ 0 et 60%, de manière préférée entre 0 et 40% et de façon tout à fait préférée entre 0 et 20 %. En outre, selon un mode de réalisation avantageux, les propriétés de trimérisation et de liaison au penton-base de la fibre adénovirale mutée ne sont pas affectées. Ces propriétés sont aisément vérifiées selon la technique mise en œuvre dans les Exemples qui suivent.

La présente invention présente notamment l'avantage de proposer de nouveaux produits dont les propriétés permettent de diminuer les quantités thérapeutiques d'adénovirus à administrer et de cibler l'infection du vecteur au niveau des cellules à traiter. Cette spécificité est particulièrement indispensable lorsque l'on met en œuvre un vecteur adénoviral capable d'exprimer un gène cytotoxique afin d'éviter la propagation de l'effet cytotoxique aux cellules saines et non ciblées. En outre, les enseignements de la présente invention permettent le développement d'autres systèmes de ciblage destinés aux développements de méthodes de traitement par administration de vecteurs recombinants viraux ou non viraux.

En premier lieu, la présente invention concerne la fibre d'un adénovirus modifiée comprenant au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus compris dans la région de ladite fibre s'étendant du feuillet A au feuillet B, et incluant la boucle AB. Plus particulièrement, les mutations sont préférentiellement effectuées au niveau d'un ou de plusieurs résidus compris dans la boucle AB.

Au sens de l'invention, "résidus" et "amino acides" sont des synonymes. Les termes "feuillet" et "boucles" sont définis selon Xia et al. 1994, Structure 2, 1259-1270.

Par «séquence d'acide nucléique», on entend désigner un fragment d'ADN et/ou d'ARN et/ou PNA, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel isolé ou de synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique sans limitation de taille. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agit d'un acide nucléique choisi parmi le groupe consistant en un cADN (ADN complémentaire) ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN ; un génome viral.

Par « partie » d'une séquence d'acides aminés, on entend une séquence d'acides aminés comprenant au minimum 6 acides aminés consécutifs, de préférence 10, de manière plus préférée 15, de manière encore plus préférée 20, de manière la plus préférée 30, et/ou possédant la même activité biologique que la séquence dont

ladite partie est dérivée, notamment la capacité de reconnaître et de se lier aux cellules cibles du virus.

Par « partie » d'une séquence nucléique, on entend une séquence nucléique comprenant au minimum 18 nucléotides consécutifs, de préférence 30, de manière plus préférée 45, de manière encore plus préférée 60, de manière la plus préférée 90, et/ou codant pour une séquence d'acides aminés possédant la même activité biologique que la séquence d'acides aminés codée par la séquence nucléique dont ladite partie est dérivée.

La fibre selon la présente invention peut dériver d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore être hybride et comprendre des fragments d'origines diverses, y compris des fragments d'origine hétérologue, c'est à dire non issus de fibre adénovirale ou issus de fibres non-adénovirales. Concernant les adénovirus humains, on préfère utiliser ceux de sérotype C et, notamment, les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5). La fibre d'Ad2 comporte 580 acides aminés (aa) dont la séquence est divulguée dans Herissé et al. (1981, Nucleic Acid Res. 9, 4023-4042, incorporé par référence à la présente demande). Celle d'Ad5 a été déterminée par Chroboczek et Jacrot (1987, Virology 161, 549-554, incorporé par référence) et présente 582 acides aminés (voir identificateur de séquence 1 ; SEQ ID NO: 1). Afin de simplifier l'exposé de la présente demande, seules les positions relatives à Ad5 sont indiquées. Toutefois, il est à la portée de l'homme du métier d'identifier les positions équivalentes des différents feuillets et boucles sur la base des séquences de fibres adénovirales d'autres origines. Lorsque la fibre de la présente invention est d'origine animale, on a de préférence recours aux adénovirus bovins et, en particulier, ceux de la souche BAV-3. Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses études et la séquence de la fibre est divulguée dans la demande internationale WO95/16048, dont le contenu est incorporé par référence. Bien entendu, la fibre de la présente invention peut, outre les modifications décrites dans la présente invention, présenter d'autres modifications par rapport à la séquence native pour autant qu'elles n'affectent pas les caractéristiques des fibres proposées dans la demande. En outre, il est à la portée de l'homme du métier d'identifier les séquences de fibres adénovirales disponibles sur les bases de données telles que, par exemple, GenBank et d'identifier les positions équivalentes des différents feuillets et boucles tels que décrits plus avant. A titre informatif, citons par exemple les références GenBank pour les séquences de la fibre adénovirales du sérotype humain 2 (# AAA92223), 3 (# CAA26029), 5 (#M18369), 31 (#CAA54050 ou 41

(#X17016). Les contenus des publications ou des références GenBank citées ci-dessus sont incorporés par référence à la présente demande dans leur intégralité.

L'invention concerne également une fibre modifiée selon la présente invention qui renferme en outre d'autres mutations telles que par exemple celles décrites dans la

5 demande de brevet WO 98/44121. Plus particulièrement, une telle fibre selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une ou plusieurs mutations au niveau :

- a) des boucles CD, DG, GH, HI et/ou IJ
et/ou
- 10 b) des feuillets C, D, G, H, I et/ou J.

Au sens de la présente invention, "mutation" désigne une délétion, une substitution ou encore une addition d'un ou plusieurs résidus ou une combinaison de ces possibilités.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la fibre adénovirale selon
15 l'invention dérive d'une fibre d'un adénovirus de type 5 (Ad5) comprenant tout ou partie de la séquence telle que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO: 1) et se caractérise en ce qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 400 et 428, plus particulièrement comprise entre les résidus 404 et 418 et préférentiellement comprise entre les
20 résidus 404 et 408 de la SEQ ID NO: 1. De manière tout à fait préférée, une telle fibre adénovirale présente les propriétés (i) et (ii) exposées plus haut.

De manière préférée, l'invention concerne une fibre d'un adénovirus de type 5 caractérisée en ce que le résidu muté est sélectionné parmi les résidus thréonine en position 404, alanine en position 406 et sérine en position 408.

25 Du fait de leur localisation spatiale dans la fibre native, ces résidus sont susceptibles de reconnaître et/ou interagir directement ou indirectement avec le récepteur cellulaire naturel de l'adénovirus concerné.

Selon un cas particulier de l'invention, la mutation réalisée est une substitution d'au moins un acide aminé. On peut citer à ce titre les exemples suivants de fibre d'un
30 adénovirus de type 5 pour lesquels :

- le résidu sérine en position 408 est substitué par un résidu présentant au moins deux groupements carboxyle, et notamment par un résidu sélectionné dans le groupe consistant en l'acide aspartique et l'acide glutamique, et/ou
- le résidu thréonine en position 404 est substitué par un résidu glycine et /ou

- le résidu alanine en position 406 est substitué par un résidu lysine.

Il est également possible d'introduire plusieurs substitutions au sein de la région ciblée de la fibre notamment au niveau des acides aminés formant un coude, de préférence de type $\alpha\alpha$.

- 5 Conformément à l'invention, il est préférable de ne pas modifier de façon drastique la structure tridimensionnelle de la fibre adénovirale ; ainsi, les acides aminés formant un coude seront remplacés par des résidus formant une structure similaire tels que ceux cités dans Xia et al. 1994.

- 10 La fibre de la présente invention peut également être modifiée par délétion. La région éliminée peut concerner tout ou partie du domaine exposé et, notamment de la boucle AB.

- Selon un mode de réalisation avantageux, lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs d'une boucle et/ou d'un feuillet, les résidus délétés peuvent être remplacés par des résidus d'une
15 boucle et/ ou d'un feuillet équivalent dérivé d'une fibre d'un second adénovirus susceptible d'interagir avec un récepteur cellulaire différent de celui reconnu par le premier adénovirus. Ceci permet de maintenir la structure de la fibre selon l'invention tout en lui conférant une spécificité d'hôte correspondant à celle du second adénovirus. Comme indiqué dans Xia et al. (1994) l'infection des
20 adénovirus de types 2 et 5 est différente de celle des adénovirus de types 3 et 7. Ainsi, les résidus délétés d'une fibre d'Ad5 ou d'Ad2 délétée d'au moins 3 résidus consécutifs parmi ceux spécifiés ci-dessus peuvent être substitués par les résidus issus d'une région équivalente de la fibre d'Ad3 ou d'Ad7 pour réduire la capacité de ladite fibre à lier le récepteur d'Ad5 et lui conférer une nouvelle spécificité
25 envers le récepteur cellulaire d'Ad3 ou d'Ad7.

- La présente invention concerne également une fibre d'un adénovirus présentant une capacité de liaison au récepteur cellulaire naturel substantiellement réduite telle que présentée ci-dessus et néanmoins capable de trimériser. Une telle propriété est notamment déterminée par la technique décrite dans la partie
30 expérimentale de la demande.

- Selon un mode de réalisation également avantageux, la fibre selon l'invention comprend en outre un ligand. Au sens de la présente invention, le terme ligand définit toute entité capable de reconnaître et se lier, de préférence avec une forte affinité, un anti-ligand cellulaire différent du récepteur cellulaire naturel de la fibre
35 adénovirale, non mutée. Cet anti-ligand peut être exprimée ou exposée à la

surface de la cellule que l'on désire cibler (marqueur de surface cellulaire, récepteur, peptide antigénique présenté par les antigènes d'histocompatibilité...), de façon naturelle ou suite à une modification de ladite cible visant à lui faire exprimer ou exposer un tel anti-ligand à sa surface. Conformément aux buts
5 poursuivis par la présente invention, un ligand peut être un anticorps ou un fragment d'anticorps, un lipide, un glycolipide, une hormone, un polypeptide, un polymère (PEG, polylysine, PEI, ...) ou encore un sucre. Le terme anticorps désigne notamment les anticorps monoclonaux, les fragments d'anticorps (tels que par exemple le Fab) et les anticorps simple chaîne (scFv). Ces dénominations et
10 abréviations sont conventionnelles dans le domaine de l'immunologie.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être intéressant de cibler plus particulièrement une cellule tumorale, une cellule infectée, un type cellulaire particulier ou une catégorie de cellules portant un marqueur de surface spécifique. Par exemple, si la cellule hôte à cibler est une cellule infectée par le virus HIV
15 (Human Immunodeficiency Virus), le ligand peut être un fragment d'anticorps contre la fusine, le récepteur CD4 ou contre une protéine virale exposée (glycoprotéine d'enveloppe) ou encore la partie de la protéine TAT du virus HIV s'étendant des résidus 37 à 72 (Fawell et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 664-668). S'agissant d'une cellule tumorale, le choix se portera sur un ligand
20 reconnaissant un antigène spécifique de tumeur (par exemple la protéine MUC-1 dans le cas du cancer du sein, certains épitopes des protéines E6 ou E7 du papilloma virus HPV) ou surexprimé (récepteur à l'IL-2 surexprimé dans certaines tumeurs lymphoïdes). Si l'on désire cibler les lymphocytes T, on peut employer un ligand du récepteur de cellule T. Par ailleurs, la transferrine est un bon candidat
25 pour un ciblage hépatique. D'une manière générale, les ligands qui peuvent être utilisés dans le contexte de l'invention sont largement décrits dans la littérature et peuvent être clonés par les techniques standards. Il est également possible de les synthétiser par voie chimique et les coupler à la fibre selon l'invention. A cet égard, le couplage de résidus galactosyl devrait conférer une spécificité hépatique en
30 raison de l'interaction avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines. Mais le mode de réalisation préféré consiste à insérer le ligand à l'extrémité C-terminale de la fibre selon l'invention ou en remplacement des résidus délétés lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs.

Un autre objet de l'invention concerne un fragment peptidique caractérisé en ce
35 qu'il comprend la région s'étendant du feuillet A au feuillet B et incluant la boucle

AB d'une fibre modifiée telle que décrite ci-dessus. Un tel fragment peptidique possède notamment les propriétés suivantes :

(i) lorsque ce fragment peptidique est incorporé en lieu et place d'une région s'étendant du feuillet A au feuillet B et incluant la boucle AB d'une
5 adénovirale hétérologue donnée, la particule adénovirale comprenant ladite fibre mutée ne se fixe pas de manière substantielle aux récepteurs cellulaires naturels

(ii) lorsque la particule adénovirale comprenant ladite fibre mutée selon
(i) comprend en outre un ligand spécifique d'un anti-ligand, il est possible de conférer à ladite particule modifiée un nouveau tropisme envers un ou plusieurs
10 types cellulaires spécifiques portant à leur surface ledit anti-ligand par comparaison à la particule adénovirale ne comprenant pas une telle fibre mutée.

L'invention concerne plus spécifiquement un tel fragment peptidique caractérisé en ce qu'il s'agit de la séquence s'étendant du résidu 388 au résidu 592 d'une fibre d'un adénovirus de type 5 (Ad5) comprenant tout ou partie de la séquence telle
15 que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO: 1) et comprenant au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 400 et 428.

La présente invention concerne également une particule adénovirale qui comprend à sa surface une fibre mutée selon l'invention, et éventuellement un ligand tel que
20 défini ci-dessus. Selon un cas préférée, cette particule adénovirale est dépourvue de fibre native fonctionnelle. La fibre mutée de l'invention peut être exprimée par le génome adénoviral lui-même, notamment lorsque ladite particule adénovirale renferme un tel génome, ou apportée *en trans* par une lignée cellulaire de complémentation, telle que celles définies ci-après. Selon un mode de réalisation
25 particulier, la particule adénovirale de l'invention est telle que présentée ci-dessus et est caractérisée en ce que ledit ligand est inséré dans une protéine de la capsid adénovirale autre que la fibre, notamment l'hexon ou le penton.

Selon un cas particulier de l'invention, ladite particule adénovirale de l'invention est "vide", c'est à dire qu'elle ne renferme pas d'acide nucléique. L'utilisation de telles
30 particules virales est notamment illustrée dans le document WO95/21259 cité plus avant. Lorsqu'au contraire cette particule adénovirale renferme un génome adénoviral, on parlera préférentiellement de virus adénoviral (ou adénovirus) et dans le cas particulier selon lequel ledit génome est en outre modifié, on parlera plus spécialement de virus adénoviral recombinant (ou adénovirus recombinant).

De tels cas sont décrits plus en détail ci-après. L'invention concerne donc également de tels adénovirus et adénovirus recombinants.

Selon l'invention, ledit ligand peut être couplé de manière chimique à ladite particule adénovirale. Toutefois, on préfère la variante selon laquelle les
5 séquences codant pour le ligand sont insérées au sein du génome adénoviral, et préférentiellement, au sein des séquences codant pour la fibre modifiée selon l'invention, et plus spécifiquement en phase afin de préserver le cadre de lecture. L'insertion peut avoir lieu à un endroit quelconque. Néanmoins, le site d'insertion préféré est en amont du codon stop à l'extrémité C-terminale ou à la place des
10 résidus délétés. Il est également envisageable d'introduire les séquences du ligand au sein d'autres séquences adénovirales, notamment celles codant pour une autre protéine de capsid, comme l'hexon ou le penton.

Avantageusement, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif pour la réplication, c'est à dire incapable de réplication autonome dans une cellule hôte. La
15 déficience est obtenue par mutation ou délétion d'un ou plusieurs gènes viraux essentiels et, notamment, de tout ou partie de la région E1 dans le génome adénoviral. Des délétions au sein de la région E3 peuvent être envisagées pour accroître les capacités de clonage. Cependant, il peut être avantageux de conserver les séquences codant pour la protéine gp19k (Gooding et Wood, 1990,
20 Critical Reviews of Immunology 10, 53-71) afin de moduler les réponses immunitaires de l'hôte. Bien entendu, le génome d'un adénovirus selon l'invention peut également comprendre des délétions ou mutations supplémentaires affectant d'autres régions, notamment les régions E2, E4 et/ou L1-L5 (voir par exemple WO94/28152 ou WO 9412649 ou Ensinger et al., 1972, J. Virol. 10, 328-339
25 décrivant la mutation thermosensible du gène DBP de E2).

Selon un mode de réalisation préféré, un adénovirus recombinant de l'invention comprend un ou plusieurs gène(s) d'intérêt placé(s) sous le contrôle des éléments nécessaires à son (leur) expression dans une cellule hôte. Le gène en question peut être d'une origine quelconque, génomique, ADNc (ADN complémentaire) ou
30 hybride (minigène dépourvu d'un ou plusieurs introns). Il peut être obtenu par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire ou par synthèse chimique. Il peut coder pour un ARN anti-sens, un ribozyme ou un ARNm qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt. Celui-ci peut être cytoplasmique, membranaire ou être sécrété par la cellule hôte. Par ailleurs, il peut s'agir de tout ou partie d'un
35 polypeptide tel que trouvé dans la nature, d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses, ou d'un polypeptide muté par rapport à

la séquence native présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser les gènes codant pour les polypeptides suivants :

- 5 - cytokines ou lymphokines (interférons α , β et γ , interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, facteurs nécrosant des tumeurs (TNF), facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...);
- récepteurs cellulaires ou nucléaires, notamment ceux reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites) et, de préférence,
10 par le virus VIH ou leurs ligands ;
- protéines impliquées dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine ou minidystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormones de croissance (hGH) ;
- 15 - enzymes (uréase, rénine, thrombine....);
- inhibiteurs d'enzymes (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...);
- polypeptides à effet anti-tumoral capables d'inhiber au moins partiellement l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (anticorps, inhibiteurs
20 agissant au niveau de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple p53 ou Rb, protéines stimulant le système immunitaire....);
- protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou protéines régulatrices agissant sur l'expression des gènes correspondants ;
- 25 - polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (polypeptides antigéniques ayant des propriétés immunogènes, épitopes antigéniques, anticorps, variants transdominants susceptibles d'inhiber l'action d'une protéine native par compétition...);
- 30 - toxines (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique.....) ou immunotoxines ; et
- marqueurs (β -galactosidase, luciférase....).

Il est à signaler que cette liste n'est pas limitative et que d'autres gènes peuvent également être employés.

Par ailleurs, un adénovirus recombinant selon l'invention peut, en outre, comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les
5 cellules infectées. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transferase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl
10 l'homme du métier. Transferase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de

Par éléments nécessaires à l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule hôte, on entend l'ensemble des éléments permettant sa transcription en ARN et la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Dans le cadre de la présente invention, il peut dériver d'un
15 gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale et peut être constitutif ou réguleable. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif réguleable ou vice versa, introduire un site de restriction..... Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène à exprimer. On peut
20 mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs viraux CMV (Cytomegalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1, précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), adénoviral MLP ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain, α 1-antitrypsine (foie-spécifique), immunoglobulines (lymphocyte-spécifique).

25 Bien entendu, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention peut en outre comprendre des éléments additionnels nécessaires à l'expression (séquence intronique, séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction de type IRES ou autre....) ou encore à sa maintenance dans la cellule hôte. De tels éléments sont
30 connus de l'homme du métier.

La présente invention a également trait à un fragment d'ADN codant pour une fibre ou un fragment peptidique selon l'invention, ainsi qu'à un vecteur d'expression d'une telle fibre ou d'un tel fragment. Tout type de vecteur peut être employé à cet effet, qu'il soit d'origine plasmidique ou virale, intégratif ou non. De tels vecteurs
35 sont disponibles commercialement ou décrits dans la littérature. De même,

l'homme du métier est capable d'adapter les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN selon l'invention. Selon un cas particulier de l'invention, un dit vecteur sera un vecteur adénoviral capable de produire dans des conditions appropriées de culture des particules adénovirales selon l'invention, à savoir des adénovirus ou des adénovirus recombinants tels que décrits précédemment.

L'invention concerne également un procédé de préparation de particules adénovirales selon l'invention selon lequel :

- on transfecte le génome adénoviral codant pour une fibre modifiée selon l'invention dans une lignée cellulaire appropriée, par exemple la lignée 293 ;

- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus ou dudit adénovirus recombinant, et

- on récupère les particules vides en purifiant le lysat cellulaire sur un gradient de densité, notamment un gradient de chlorure de césium par exemple.

Les particules vides sédimentent par exemple à 1,3 g/ml de chlorure de césium tandis que les adénovirus (particules renfermant le génome Ad) recombinants sédimentent pour leur part à 1,34 g/ml (D'Hallivin, 1995, Cur. Top. Microbiol. Immunol, 199, 47-66).

- 20 Selon un autre procédé, il est possible d'obtenir des particules vides après transfection d'un génome adénoviral portant une séquence d'encapsidation modifiée et renfermant en outre un fragment d'ADN codant pour une fibre modifiée selon l'invention dans des cellules appropriées. La modification de la région d'encapsidation permet de réduire, voir éliminer, le phénomène d'encapsidation du génome adénoviral dans les particules (Gräble et Hearing, 1992, J. Virol. 66, 723-731). Les étapes de production qui suivent la culture sont identiques à celles précédemment décrites.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un adénovirus ou d'un adénovirus recombinant selon l'invention, selon lequel :

- 30 - on transfecte le génome dudit adénovirus, recombinant ou non, défectif pour la réplication ou non, dans une lignée cellulaire appropriée,
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus ou dudit

adénovirus recombinant (on peut également dire, particules adénovirales),
et

on récupère ledit adénovirus ou ledit adénovirus recombinant dans la
culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie
ledit adénovirus.

Le choix de la lignée cellulaire dépend le cas échéant des fonctions déficientes de
l'adénovirus selon l'invention. On utilisera notamment une lignée de
complémentation capable de fournir *en trans* la ou les fonction(s) défectueuse(s).
Les lignées 293 (ATCC CRL1573) ou PERC6 (ECACC 96022940) conviennent
tout particulièrement pour compléter la fonction E1 (Graham et al., 1977, J.
Gen. Virol. 36, 59-72 ou WO 97/00326, respectivement). Pour une double
déficiency E1 et E2 ou E4, on peut employer une lignée parmi celles décrites dans
la demande de brevet français FR2737222 (96 04413). On peut également mettre
en œuvre un virus auxiliaire pour compléter l'adénovirus défectif selon
l'invention dans une cellule hôte quelconque ou encore un système mixte utilisant
cellule de complémentation et virus auxiliaire dans lequel les éléments sont
dépendants les uns des autres. Les moyens de propagation d'un adénovirus
défectif sont connus de l'homme du métier qui peut se référer par exemple à
Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol 7, p 190-128 ; Ed E.J.
Murey, The Human Press Inc.). Le génome adénoviral est de préférence
reconstitué *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par ligation ou encore
recombinaison homologue (voir par exemple la demande française FR2727689 (94
14470)). Les procédés de purification sont décrits dans l'état de la technique. On
peut citer la technique de centrifugation sur gradient de densité.

Selon un procédé alternatif, il est également possible de construire des particules
adénovirales "vides" de manière artificielle par l'association des extrémités carboxy
ou amino-terminales de protéines, peptides ou glycoprotéines de la capside
adénovirale à des lipides. De tels lipides modifiés, incorporants notamment les
fragments peptidiques de l'invention, peuvent ensuite être incorporés dans un
liposome. Une telle technique a été décrite par Tikchonenko et al., 1988, Gene, 63,
321-330 dans le cas de liposomes portant à leur surface des glycoprotéines du
virus influenza.

La présente invention concerne également une lignée cellulaire comprenant soit
sous forme intégrée dans le génome ou sous forme d'épisome un fragment d'ADN
codant pour une fibre selon l'invention placé sous le contrôle des éléments

permettant son expression. Ladite lignée peut dériver d'une cellule de complémentation d'une ou plusieurs fonctions adénovirales sélectionnées parmi celles codées par les régions E1, E2, E4 et L1-L5. Elle dérive de préférence de la lignée 293 ou de la lignée PERC6. Une telle lignée peut être utile à la préparation d'un adénovirus, notamment recombinant, dont le génome est dépourvu de tout ou partie des séquences codant pour la fibre (de manière à produire une fibre non fonctionnelle ou à ne pas produire de fibre).

C'est pourquoi, l'invention concerne en outre un procédé pour produire des particules adénovirales renfermant un génome adénoviral dépourvu de tout ou partie des séquences codant pour une fibre, caractérisé en ce que :

- on transfecte ledit génome dans une lignée cellulaire présentée ci-dessus,
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule adénovirale, et
- on récupère ladite particule adénovirale dans la culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie ladite particule adénovirale.

La présente invention couvre également une cellule hôte infectable par un adénovirus selon l'invention ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention. Il s'agit avantageusement d'une cellule de mammifère et, notamment, d'une cellule humaine. Elle peut être primaire ou tumorale et d'une origine quelconque, par exemple hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage ...), musculaire, nasale, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

L'invention a également pour objet une composition comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, une cellule hôte, une particule adénovirale ou un adénovirus, notamment recombinant, selon l'invention ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que les maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète ou myopathie de Duchenne, de Becker...), les cancers, comme ceux induits par des oncogènes ou des virus, les maladies virales, comme l'hépatite B ou C et le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise résultant de l'infection par le VIH), et les maladies

virales récurrentes, comme les infections virales provoquées par le virus de l'herpès.

Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace
5 de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Un tel support est non toxique pour le patient. Il peut s'agir de solution injectable, de solution isotonique, dont le pH est compatible avec un usage in vivo, de solution de dextrose, de glycérol, de mannitol, Une composition selon l'invention peut être administrée par voie locale, systémique ou par aérosol,
10 en particulier par voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres,
15 par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. En particulier, les particules virales selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} ufp (unités formant des plages), avantageusement 10^5 et 10^{13} ufp et, de préférence, 10^6 et 10^{12} ufp. La formulation peut également inclure un adjuvant ou un excipient
20 acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

La composition selon l'invention peut en outre être formulée sous la forme d'une préparation solide, semi-solide, en particulier sous forme de gaz, de tablette, capsule, poudre, gélule, granule, crème, solution, suppositoire, aérosol, en fonction de la voie d'administration sélectionnée.

25 Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention, la composition peut être formulée avec des supports pharmaceutiques classiques, connus de l'homme du métier.

Ces supports comprennent en particulier un véhicule pharmaceutique tel que la gélatine, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, le
30 saccharose, la gomme arabique ou analogues.

On peut également obtenir une préparation de gélules en mélangeant la composition avec un diluant et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures.

Une préparation sous forme de sirop ou d'élixir peut contenir la composition
35 conjointement avec un édulcorant, un antiseptique, ainsi qu'un agent donnant du goût et un colorant approprié.

Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir la composition en mélange avec des agents de dispersion ou des agents mouillants, ou des agents de mise en suspension, de même qu'avec des correcteurs du goût ou des édulcorants.

- 5 Pour une administration rectale, on recourt à des suppositoires qui sont préparés avec des liants fondant à la température rectale, par exemple du beurre de cacao ou des polyéthylèneglycols.

La composition peut être formulée également sous forme de microcapsules, éventuellement avec un ou plusieurs supports additifs.

- 10 La présente invention a également pour objet une composition caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé sélectionné parmi un acide nucléique nu ou un acide nucléique combiné à au moins un composé cationique.

- En vue de leur utilisation *in vivo*, les particules adénovirales selon l'invention peuvent en outre être complexées à des composés synthétiques ou naturels.
- 15 telles particules adénovirales ainsi que leur utilisation sont par exemple décrites dans O'Riordan et al., 1999, Human Gene Therapy, 10, 1349-1358 ou dans la demande de brevet WO98/44143. Le contenu de ces documents est incorporé par référence dans la présente demande.

- Enfin, la présente invention est relative à l'utilisation d'un fragment peptidique,
- 20 d'une particule adénovirale, d'un adénovirus ou d'une cellule hôte selon l'invention ou d'un adénovirus susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans
- 25 les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

- L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on
- 30 administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un adénovirus ou d'une cellule hôte selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

EXEMPLES

Les exemples qui suivent ont pour but d'illustrer les différents objets de la présente invention et n'ont par conséquent aucun caractère limitatif.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un
5 kit commercial. Les étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens sont réalisées de préférence dans la souche *E. coli* 5K (Hubacek et Glover, 1970, J. Mol. Biol. 50, 111-127) ou BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). On utilise préférentiellement cette dernière souche pour les étapes de recombinaison homologue. La souche NM522 (Stratagène) convient à la
10 propagation des vecteurs phagiques M13. Les techniques d'amplification par PCR sont connues de l'homme du métier (voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à
15 l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Les séquences nucléotidiques Ad5 sont celles utilisées dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer la
20 technique au phosphate de calcium (Maniatis et al., *supra*), mais tout autre protocole peut également être employé, tel que la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection ou les méthodes basées sur l'emploi de lipides cationiques. Quant aux conditions de culture, elles sont classiques. Dans les exemples qui suivent, on a recours à la
25 lignée humaine 293 (ATCC CRL1573) et aux lignées murines Swiss 3T3 (ATCC CCL92), NR6 (Wells et al., 1990, Science 247: 962-964) et NR6-hEGFR (Schneider et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 333-336). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent également être utilisées.

EXEMPLE 1 : Construction d'un adénovirus présentant un tropisme d'hôte envers
30 les cellules exprimant le récepteur du GRP (pour gastrin releasing peptide en anglais).

A. Insertion des séquences codant pour le ligand GRP (fibre-GRP).

Le plasmide pTG6593 dérive du p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) par introduction du gène complet codant pour la fibre d'Ad5 sous la forme
35 d'un fragment *EcoRI-SmaI* (nucléotides (nt) 30049 à 33093). Le fragment *HindIII-*

*Sma*I (nt 31994-33093) est isolé et cloné dans M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99) digéré par ces mêmes enzymes, pour donner M13TG6526. Ce dernier est soumis à une mutagénèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide oTG7000 (SEQ ID NO: 2) (kit Sculptor, in vitro mutagenesis, Amersham) afin d'introduire un adaptateur codant pour un bras espaceur de 12 acides aminés de séquence PSASASASAPGS. Le vecteur muté ainsi obtenu, M13TG6527, est soumis à une seconde mutagénèse permettant d'introduire la séquence codant pour les 10 résidus du peptide GRP (GNHWAVGHLM ; Michael et al., 1995, Gene Ther. 2, 660-668). On utilise à cet effet l'oligonucléotide oTG7001 (SEQ ID NO: 3). Le fragment *Hind*III-*Sma*I est isolé du phage muté M13TG6528 et introduit par la technique de recombinaison homologue (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) dans le plasmide pTG6590 portant le fragment de génome adénoviral Ad5 s'étendant des nt 27081 à 35935 et linéarisé par *Mun*I (nt 32825). Le fragment *Spe*I-*Sal*I (portant les nt 27082 à 35935 du génome Ad5 modifiés par introduction du bras espaceur et du peptide GRP) est isolé du vecteur précédent désigné pTG8599 puis est échangé contre le fragment équivalent de pTG6591 préalablement digéré par ces mêmes enzymes. A titre indicatif, pTG6591 comprend les séquences adénovirales sauvages des positions 21562 à 35935. On obtient pTG4600 dont on isole le fragment *Bst*EII (nt 24843 à 35233). Après recombinaison homologue avec le plasmide pTG3602 qui comprend le génome Ad5 (décrit plus en détail dans la demande internationale WO96/17070), on génère le vecteur pTG4601.

Une cassette permettant l'expression du gène LacZ est introduite à la place de la région adénovirale E1 par recombinaison homologue entre le plasmide pTG4601 linéarisé par *Cla*I et un fragment *Bsr*GI-*Pst*II comprenant le gène LacZ codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur MLP d'Ad2 et le signal de polyadénylation du virus SV40. Ce fragment est isolé du vecteur pTG8526 contenant l'extrémité 5' de l'ADN génomique viral (nt 1 à 6241) dans lequel la région E1 (nt 459 à 3328) est remplacée par la cassette d'expression LacZ. Sa construction est à la portée de l'homme du métier. Le vecteur final est désigné pTG4628.

Les virus correspondants AdTG4601 et AdTG4628 sont obtenus par transfection des fragments adénoviraux libérés des séquences plasmidiques par digestion *Pac*I dans la lignée 293. A titre indicatif, AdTG4601 porte le génome Ad5 complet dans lequel le gène de la fibre comprend en son extrémité 3' un bras espaceur suivi du peptide GRP. Le virus recombinant AdTG4628 porte en outre la

cassette d'expression du gène rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur adénoviral MLP.

B. Etude du tropisme du virus portant la fibre-GRP.

La présence du peptide GRP au niveau de la fibre adénovirale permet de cibler les cellules exprimant à leur surface le récepteur au GRP. L'expression des messagers codant pour ce dernier est étudiée dans les cellules 293 et dans les cellules murines Swiss-3T3 (Zachary et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7616-7620) par Northern-blot. On utilise à titre de sonde un mélange de 2 fragments d'ADN complémentaires à la séquence codant pour le récepteur au GRP marqués par les techniques conventionnelles à l'isotope ^{32}P . A titre indicatif, les fragments sont produits par PCR réverse à partir des ARN cellulaires totaux à l'aide des oligonucléotides oTG10776 (SEQ ID NO: 4) et oTG10781 (SEQ ID NO: 5) (Battey et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 395-399 ; Corjay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 18771-18779). L'intensité des ARNm détectés est beaucoup plus importante dans le cas des cellules Swiss-3T3 que dans les cellules 293, indiquant la surexpression du récepteur GRP par la lignée murine.

Des expériences de compétition sont réalisées sur les 2 types de cellules. Le compétiteur est constitué par la tête de la fibre d'Ad5 produite dans *E.coli* dont les propriétés de liaison au récepteur cellulaire adénoviral ont été montrées (Henry et al., 1994, J. Virol 68, 5239-5246). Les cellules en monocouche sont préalablement incubées pendant 30 min en présence de PBS ou de concentrations croissantes de tête Ad5 recombinante (0,1 à 100 µg/ml) dans du milieu DMEM (Gibco BRL) complémenté avec du sérum de veau foetal 2% (FCS). Puis, le virus AdTG4628 dont la fibre contient le peptide GRP est ajouté à une multiplicité d'infection de 0,001 unité infectieuse/cellule pour 24h à 37°C. On utilise à titre de contrôle et selon les mêmes conditions expérimentales, le virus recombinant AdLacZ (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 626-630) qui porte un gène de la fibre natif. Les cellules sont ensuite fixées et l'expression du gène LacZ évaluée (Sanes et al., 1986, EMBO J. 5, 3133-3142). Le nombre de cellules bleues est représentatif de l'efficacité de l'infection virale. Une inhibition par compétition se traduit par une réduction du nombre de cellules colorées par rapport à un témoin non infecté (PBS).

L'addition de tête Ad5 recombinante à une concentration de 100 µg/ml inhibe fortement l'infection des cellules 293 par les virus AdLacZ et AdTG4628 (taux d'inhibition de 95 et 98%). Ceci suggère que la présence du compétiteur empêche

l'interaction de la fibre adénovirale avec son récepteur cellulaire naturel. Par contre, les deux virus ont un comportement différent sur les cellules Swiss-3T3. L'infection du virus AdTG4628 en présence de 100 µg/ml de compétiteur n'est que partiellement inhibée alors que, dans les mêmes conditions expérimentales, celle du virus AdLacZ ayant la fibre native est totalement inhibée. Ces résultats suggèrent que l'infection des cellules Swiss-3T3 par l'AdTG4628 est en partie médiée par un récepteur indépendant, probablement le récepteur au GRP que ces cellules surexpriment. En conclusion, l'addition du ligand GRP à l'extrémité C-terminale de la fibre favorise l'infection des cellules exprimant le récepteur au GRP d'une manière indépendante de l'interaction fibre-récepteur cellulaire naturel

EXEMPLE 2: Construction d'un adénovirus présentant un tropisme envers les cellules tumorales exprimant des mucines

Construction: Insertion du peptide EPPT, tel que décrit dans le brevet US 5,591,593, en C-term de la fibre. Cette modification confère une liaison à mucines surexprimées sur cellules tumorales.

OTG11992: SEQ ID N° 12

mutagenese avec m13TG6527 pour donner m13TG6572. Recombinaison homologue avec pTG4213 pour donner pTG4278.

EXEMPLE 3: Construction d'un adénovirus présentant un tropisme envers les cellules tumorales exprimant des intégrines $\alpha_4\beta_1$

Construction: Insertion du peptide LDV, comme décrit dans le brevet US 5,628,979, en C-term de la fibre. Cette modification confère une liaison à intégrines $\alpha_4\beta_1$ surexprimées sur cellules tumorales.

OTG 11991 : SEQ ID N° 13

Mutagenese avec m3TG6527 pour donner M13TG13265.

EXEMPLE 4 : Construction d'un adénovirus présentant un tropisme d'hôte envers les cellules exprimant le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor en anglais).

Cet exemple décrit une fibre portant les séquences EGF à son extrémité C-terminale. Pour cela, on met en oeuvre les oligonucléotides oTG11065 (SEQ ID NO: 6) et oTG11066 (SEQ ID NO: 7) pour amplifier un fragment *HindIII-XbaI* à partir du plasmide M13TG6527. Les oligonucléotides oTG11067 (SEQ ID NO: 8) et oTG11068 (SEQ ID NO: 9) permettent de générer un fragment *XhoI-SmaI* (allant

du codon stop jusqu'au nt 33093) à partir de M13TG6527. L'ADN complémentaire de l'EGF, obtenu de l'ATCC (#59957), est amplifié sous forme d'un fragment *XhoI*-*XbaI* à l'aide des oligonucléotides oTG 11069 (SEQ ID NO: 10) et oTG11070 (SEQ ID NO: 11). Les 3 fragments digérés par les enzymes adéquates sont ensuite
5 reliés pour donner un fragment *HindIII*-*SmaI* contenant l'EGF fusionné à l'extrémité C-terminale de la fibre. On applique la même procédure de recombinaison homologue que celle décrite à l'exemple 1 pour remplacer ce fragment dans son contexte génomique.

Cependant, on peut simplifier les étapes de clonage en introduisant un site
10 unique *BstBI* dans la région ciblée par les techniques classiques de mutagenèse. On obtient pTG4609. La recombinaison homologue entre pTG4609 linéarisé par *BstBI* et le fragment *HindIII*-*SmaI* précédant génère le plasmide pTG4225 portant la région E1 sauvage. Son équivalent portant la cassette d'expression LacZ pTG4226 est obtenu par recombinaison homologue avec le pTG4213 digéré par
15 *BstBI*. Les virus AdTG4225 et AdTG4226 peuvent être produits classiquement par transfection d'une lignée cellulaire appropriée par exemple surexprimant le récepteur de l'EGF.

Pour tester la spécificité d'infection de ces virus, on peut utiliser les cellules fibroblastiques murines NR6 et les cellules NR6-hEGFR exprimant le récepteur de
20 l'EGF humain. Des compétitions avec la tête d'Ad5 recombinante ou avec l'EGF permettent d'évaluer l'intervention des récepteurs cellulaires naturels et EGF pour médier l'infection des virus.

EXEMPLE 5 : Modifications de la tête de la fibre pour éliminer la liaison au récepteur cellulaire naturel.

25 A. Modifications des séquences de la fibre

La mutation de la région AB (amino acide 404-418) de la fibre adénovirale a été entreprise afin d'éliminer la capacité de la fibre à lier son récepteur naturel et l'addition d'un ligand permettra de modifier le tropisme des adénovirus correspondants.

30 - le remplacement dans la boucle AB de la sérine en position 408 par le résidu acide glutamique du sérotype 3 à l'aide de l'oligo oTG12499 (SEQ ID NO 14);

- le remplacement dans la boucle AB de l'Alanine en position 406 par le résidu lysine du sérotype 3 à l'aide de l'oligo oTG12498 (SEQ ID NO 15);

- le remplacement dans la boucle AB de la thréonine en position 404 par le résidu glycine du sérotype 3 à l'aide de l'oligo oTG12740 (SEQ ID NO 16).

Les mutagénèses peuvent être réalisées sur le vecteur M13TG6526 ou M13TG6528. Le premier porte le fragment *HindIII-SmaI* sauvage et le second ce même fragment modifié par l'insertion des séquences GRP. Les plasmides portant le génome adénoviral peuvent être reconstitués comme décrit auparavant pour les plasmides pTG4225 (E1 sauvage) et pTG4226 (LacZ à la place de la région E1) (par recombinaison homologue avec le plasmide pTG4609 ou bien pTG4213). Les virus sont générés par transfection des cellules 293, 293 exprimant la fibre sauvage (Legrand et al., 1999; J. Virol., 73, 907-919) ou bien de cellules surexprimant le récepteur liant le ligand concerné. De telles cellules peuvent être générées par transfection de l'ADN complémentaire correspondant. On utilise de préférence des cellules qui n'expriment pas naturellement le récepteur cellulaire naturel des adénovirus, par exemple la lignée Daudi (ATCC CCL213).

Mutation	Oligo oTG-	M13 M13TG	Plasmide pTG-
<i>ABloop (404-418): 404TPAPS408</i>			
404GPAPS408	12740	14017	14283
404TPKPS408	12498	6587	4289
404TPAPE408	12499	6588	4291

B. Etude de l'incorporation de la fibre modifiée dans la particule virale et de son utilisation dans l'entrée de l'adénovirus correspondant.

Pour s'assurer que les virus mutés portent bien dans leur capsid les protéines fibres modifiées, les virus purifiés après amplification dans les cellules 293 sont déposés sur gel d'acrylamide 10% en conditions dénaturantes (PAGE-SDS). Les différentes protéines sont détectées par coloration au nitrate d'argent. De manière alternative, la fibre est révélée spécifiquement en réalisant un western-blot à l'aide d'un sérum dirigé contre la tête de la fibre d'Ad5 (Henry et al., 1994, supra). Un signal intense à la taille attendue indique que les virus incorporent des quantités stoechiométriques de la protéine d'intérêt. Etant donné que seule la fibre trimérique est capable de lier le penton base (Novelli et Boulanger, 1991, supra) et

d'être incorporée dans la particule, la détection de la protéine dans l'expérience ci-dessus indique que la fibre modifiée est toujours capable de former des trimères.

L'utilisation de la fibre modifiée pour permettre l'entrée du virus muté correspondant peut être étudiée en réalisant les expériences de compétition à l'aide de tête recombinante comme décrit ci-dessus dans l'exemple 1B. Une infection efficace en présence de concentrations saturantes du peptide sauvage indique une infection indépendante de la liaison aux récepteurs primaires naturels. Ceci suggère une affinité fortement réduite de la fibre modifiée pour ses récepteurs.

10 EXEMPLE 6 : Insertion du ligand dans une protéine de capsid
autre que la fibre en association avec une des modifications de la fibre précitées.

Cet exemple décrit l'insertion du ligand EGF dans la protéine de capsid hexon. Bien entendu, il est préférable que l'adénovirus correspondant ait perdu sa capacité d'attachement au récepteur cellulaire naturel. Son génome peut par exemple inclure un gène de la fibre modifié ou être dépourvu d'une partie au moins des séquences de la fibre.

On construit un plasmide de transfert pour la recombinaison homologue couvrant la région du génome d'Ad5 codant pour l'hexon (nt 18842-21700). Le fragment d'Ad5 *HindIII-XhoI* (nt 18836-24816) est cloné dans pBSK+ (Stratagène) digéré par ces mêmes enzymes pour donner le plasmide pTG4224. Les séquences codant pour le peptide EGF sont introduites dans la boucle hypervariable L1 de l'hexon par création de fragments chimériques par PCR : hexon (nt19043-19647)-*XbaI*-EGF-*BsrGI*-hexon (nt19699-20312). Le fragment nt19043 à 19647 est obtenu par amplification PCR à partir du plasmide pTG3602 avec les oligonucléotides oTG11102 (SEQ ID NO: 17) et oTG11103 (SEQ ID NO: 18). Le fragment nt19699 à 20312 est amplifié à partir du même ADN avec les oligonucléotides oTG11104 (SEQ ID NO: 19) et oTG11105 (SEQ ID NO: 20). L'EGF est cloné à partir de l'ADNc à l'aide des oligonucléotides oTG11106 (SEQ ID NO: 21) et oTG11107 (SEQ ID NO: 22) permettant de mettre la séquence codante de l'EGF en phase avec l'hexon. Les produits PCR sont digérés par les enzymes adéquates puis religués. Le fragment chimérique peut alors être inséré par recombinaison homologue dans le plasmide pTG4224 linéarisé par *NdeI* (nt 19549), pour donner pTG4229. Les séquences codant pour l'hexon modifié peuvent être obtenues par digestion *HindIII-XhoI* et remplacées dans leur contexte génomique par recombinaison homologue. On peut utiliser le vecteur pTG3602,

pTG4607, pTG4629 linéarisé par *SgfI* ou un vecteur portant le génome adénoviral délété des séquences de la fibre (comme pTG4607 décrit ci-dessous) ou exprimant une fibre modifiée.

Le génome adénoviral incapable de produire une fibre native fonctionnelle est
5 obtenu par une délétion touchant le codon initiateur mais ne s'étendant pas aux autres ORFs adénoviraux. On procède de la façon suivante: le fragment adénoviral en 5' de la délétion (nt 30564 à 31041) est amplifié par PCR à l'aide des amorces oTG7171 et oTG7275 (SEQ ID NO: 23 et 24). L'amplification du fragment en 3' (nt 31129 à 33099) met en oeuvre les amorces oTG7276 et oTG7049 (SEQ ID NO: 25
10 et 26). Les fragments PCR sont digérés par *XhoI* et mis en ligation avant d'être introduits par recombinaison homologue dans le vecteur pTG6591 linéarisé par *NdeI*, pour donner pTG4602. Puis le fragment *BstEII* isolé de ce dernier est soumis à une recombinaison homologue avec le vecteur pTG3602 digéré par *SpeI*. On obtient pTG4607. Le vecteur pTG4629 est équivalent à pTG4607, mais porte en
15 outre la cassette d'expression *LacZ* à la place de E1.

Les virus correspondants peuvent être obtenus après transfection de cellules 293, 293 exprimant la fibre sauvage (Legrand et al., 1999, supra) ou de cellules surexprimant le récepteur de l'EGF. L'étude de la spécificité d'infection pourra être réalisée comme décrit auparavant en utilisant l'EGF en tant que compétiteur.

Revendications

1. Fibre d'un adénovirus modifiée comprenant au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus compris dans la région de ladite fibre s'étendant du
5 feuillet A au feuillet B et incluant la boucle AB.
2. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus compris dans la boucle AB.
3. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle
10 permet, lorsqu'elle est comprise dans une particule virale, d'obtenir une dite particule virale présentant les propriétés suivantes :
 - (i) ladite particule adénovirale ne se fixe pas de manière substantielle aux récepteurs cellulaires naturels ;
 - (ii) lorsque ladite particule adénovirale comprend en outre un ligand
15 spécifique d'un anti-ligand, ladite particule modifiée a un nouveau tropisme envers un ou plusieurs types cellulaires spécifiques portant à leur surface ledit anti-ligand.
4. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle dérive d'une fibre d'un adénovirus de type 5 (Ad5) comprenant tout ou partie de la séquence telle que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID
20 NO: 1) et en ce qu'elle comprend au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 400 et 428
5. Fibre d'un adénovirus de type 5 selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 404 et 418 de la SEQ ID NO: 1.
- 25 6. Fibre d'un adénovirus de type 5 selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 404 et 408 de la SEQ ID NO: 1.
7. Fibre d'un adénovirus de type 5 selon la revendication 6, caractérisée en ce ledit résidu est sélectionné parmi les résidus thréonine en position 404, alanine en
30 position 406 et sérine en position 408.
8. Fibre d'un adénovirus de type 5 selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend une substitution du résidu sérine en position 408 par un résidu amino acide présentant au moins deux groupements carboxyle.

9. Fibre d'un adénovirus de type 5 selon la revendication 8, caractérisée en ledit résidu est sélectionné dans le groupe consistant en l'acide aspartique et l'acide glutamique.
10. Fibre d'un adénovirus de type 5 selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend une substitution du résidu thréonine en position 404 par un résidu glycine et/ou une substitution du résidu alanine en position 406 par un résidu lysine.
11. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l'une au moins des mutations est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs d'une boucle et/ou d'un feuillet de ladite région.
12. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdits résidus délétés sont remplacés par des résidus d'une boucle et/ou d'un feuillet équivalent dérivé d'une fibre d'un second adénovirus de type hétérologue, susceptible d'interagir avec un récepteur cellulaire différent dudit premier adénovirus.
13. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une ou plusieurs mutations au niveau :
- (i) des boucles CD, DG, GH, HI et/ou IJ et/ou
 - (ii) des feuillets C, D, G, H, I et/ou J.
14. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ligand capable de reconnaître un anti-ligand cellulaire différent du récepteur cellulaire naturel de la fibre non mutée.
15. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 14, caractérisée en ce que le ligand est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps ou un fragment d'anticorps, un peptide, un lipide, un glycolipide, une hormone, un polymère ou un sucre.
16. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le ligand est inséré à l'extrémité C-terminale de la fibre.
17. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le ligand est inséré en remplacement de résidus délétés.
18. Fragment peptidique caractérisé en ce qu'il comprend la région s'étendant du feuillet A au feuillet B et incluant la boucle AB d'une fibre selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

19. Fragment peptidique selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il s'agit de la séquence s'étendant du résidu 388 au résidu 592 d'une fibre selon l'une quelconque des revendications 4 à 17.
- 5 20. Fragment d'ADN ou vecteur d'expression codant pour une fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 17 ou un fragment peptidique selon l'une des revendications 18 ou 19.
- 10 21. Lignée cellulaire caractérisée en ce qu'elle comprend soit sous forme intégrée dans le génome ou sous forme d'épisome un fragment d'ADN selon la revendication 20 placé sous le contrôle des éléments permettant son expression dans ladite lignée cellulaire.
22. Lignée cellulaire selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle est en outre capable de compléter un adénovirus déficient pour une ou plusieurs fonctions sélectionnées parmi les fonctions codées par les régions E1, E2, E4 et L1-L5.
- 15 23. Lignée cellulaire selon la revendication 21 ou 22, caractérisée en ce qu'elle est produite à partir de la lignée 293.
24. Lignée cellulaire selon la revendication 21 ou 22, caractérisée en ce qu'elle est produite à partir de la lignée PERC6.
- 20 25. Particule adénovirale caractérisée en ce qu'elle est dépourvue d'une fibre native fonctionnelle et qu'elle comprend une fibre selon l'une des revendications 1 à 17.
- 25 26. Particule adénovirale caractérisée en ce qu'elle est dépourvue d'une fibre native fonctionnelle et qu'elle comprend une fibre selon l'une des revendications 1 à 17 et un ligand capable de reconnaître un anti-ligand cellulaire différent du récepteur cellulaire naturel de ladite particule.
27. Particule adénovirale selon la revendication 26, caractérisée en ce que ledit ligand est inséré dans une protéine de la capside adénovirale autre que la fibre, notamment l'hexon ou le penton.
- 30 28. Particule adénovirale selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisée en ce qu'elle est vide.
29. Particule adénovirale selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisée en ce qu'elle renferme un génome adénoviral.

30. Particule adénovirale selon la revendication 29, caractérisée en ce que ledit génome adénoviral est un génome adénoviral recombinant défectif pour la réplication.

5 31. Procédé pour produire une particule adénovirale selon la revendication 29, caractérisé en ce que :

(i) on transfecte undit génome adénoviral recombinant défectif pour la réplication dans une lignée cellulaire appropriée,

10 (ii) on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule adénovirale, et

(iii) on récupère ledit adénovirus de ladite culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie ladite particule adénovirale.

15 32. Procédé pour produire une particule adénovirale renfermant un génome adénoviral dépourvu de tout ou partie des séquences codant pour une fibre, caractérisé en ce que :

- on transfecte ledit génome dans une lignée cellulaire selon l'une des revendications 21 à 24,

20 - on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule adénovirale, et

- on récupère ladite particule adénovirale dans la culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie ladite particule adénovirale.

25 33. Composition comprenant une particule adénovirale selon l'une des revendications 25 à 30 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 31 ou 32 en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

30 34. Composition selon la revendication 33 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé sélectionné parmi un acide nucléique nu ou un acide nucléique combiné à au moins un composé cationique.

35. Utilisation d'une particule adénovirale selon l'une des revendications 25 à 30 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 31 ou 32 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal.

LISTE DE SÉQUENCES

<110> TRANSGENE SA

<110> European Molecular Biology Laboratory (EMBL)

<120> FIBRE ADÉNOVIRALE MODIFIÉE ET UTILISATIONS

<130> D18422

<140> FR 99 10859

<141> 1999-08-27

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.2

<210> 1

<211> 581

<212> PRT

<213> Mastadénovirus 5 fibre Ad5

<220>

<223> Position sur la carte: 31063 à 33120 du génome
Ad5.

<400> 1

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
 195 200 205
 Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
 210 215 220
 Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
 245 250 255
 Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
 260 265 270
 Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
 275 280 285
 Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
 290 295 300
 Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
 305 310 315 320
 Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
 325 330 335
 Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
 340 345 350
 Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
 370 375 380
 Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
 405 410 415
 Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
 420 425 430
 Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
 435 440 445
 Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
 450 455 460
 Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
 465 470 475 480
 Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
 485 490 495
 Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
 500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
530 535 540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu
580

<210> 2

<211> 60

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG7000 (code
pour PSASASASAPGS).

<400> 2

aacgattcctt tagctgccgg gagcagaggc ggaggcggag gcgctgggtt cttgggcaat 60

<210> 3

<211> 57

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG7001 (code
pour GRP).

<400> 3

aacgattcctt tacatcaggt ggcccacagc ccagtgggtt ccgctgccgg gagcaga 57

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG10776

<400> 4

ccttccacgg gaagattgta

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG10781.

<400> 5

ggggtgtctg tcttcacact

20

<210> 6

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11065.

<400> 6

gggaagcttg aggttaacct aagcac

26

<210> 7

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11066.

<400> 7

gggtctagag ctgccgggag cagaggcg

28

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11067.

<400> 8

gggctcgagt tatgtttcaa cgtgtttat

29

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11068.

<400> 9

gtgcccgagg agtttattaa tatc

24

<210> 10

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11069

(clonage EGF) issu de Homo sapiens.

<400> 10

gcgtctagaa atagtgactc tgaatgtccc c

31

<210> 11

<211> 46

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11070
(clonage EGF) issu de Homo sapiens.

<400> 11

gcgctcgagc acaaacgatt ctttagcgca gttcccacca cttcag

46

<210> 12

<211> 72

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11992.

<400> 12

cataacacaa acgattcttt atgttcgtgt tgggtggttct cgagcgcaat agctgccggg
agcagaggcg ga

60
72

<210> 13

<211> 57

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11991.

<400> 13

cataacacaa acgattcttt aatatacgtc tagatagctg ccgggagcag aggcgga

57

<210> 14

<211> 42

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG12499 issu
de Mastadénovirus.

<400> 14

gcatttagtc tacagttagg ctctggagct ggtgtggtcc ac

42

<210> 15

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG12498 issu de Mastadénovirus.

<400> 15

gtctacagtt aggagatggc tttggtgtgg tccacaaag

39

<210> 16

<211> 47

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG12740 issu de Mastadénovirus.

<400> 16

ctacagttag gagatggagc gggcccgggc cacaaagta gcttattc

47

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11102 (clonage hexon) issu de Mastadénovirus.

<400> 17

cggttcatcc ctgtggaccg tga

23

<210> 18

<211> 38

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11103 (clonage hexon) issu de mastadénovirus.

<400> 18

ggcctctaga gttgagaaaa attgcatttc cacttgac

38

<210> 19

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11104 (clonage hexon) issu de Mastadénovirus.

<400> 19

ggtattgtac agtgaagatg tag

23

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11105 issu de Mastadénovirus.

<400> 20
cggtggaagg actgtacttt agc

23

<210> 21
<211> 38
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11106 (clonage cDNA EGF) issu de Homo sapiens.

<400> 21
cgcgctctaga ggcgaatagt gactctgaat gtcccctg

38

<210> 22
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG11107 (clonage cDNA EGF) issu de Homo sapiens.

<400> 22
ccactgtaca ataccacttt agggcgagcag tcccaccact tcagg

45

<210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG7171 (délétion de la fibre) issu de Mastadénovirus.

<400> 23
atgggtaact tgcaccagt c

21

<210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG7275 (délétion de la fibre) issu de Mastadénovirus.

<400> 24

gggctcgagc tgcaacaaca tgaagat

27

<210> 25

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG7276
(délétion de la fibre) issu de Mastadénovirus.

<400> 25

ccgctcgaga ctctccctt tgtatcc

27

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG7049
(délétion de la fibre) issu de Mastadénovirus.

<400> 26

ctgcccggga gtttattaat

20

<210> 27

<211> 42

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG7416
(délétion du feuillet H) issu de Mastadénovirus.

<400> 27

tgtttctgt gtaccgttg atccttagt tttgtctccg tt

42

<210> 28

<211> 64

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce. Oligonucléotide de synthèse oTG10352
(feuillet H5 en H3) issu de Mastadénovirus.

<400> 28

tgtttctgt gtaccgttta gcatcacggt cacctcgaga ggtttagttt tgtctccgtt
taag60
64

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

[stamp]

Date of mailing (day/month/year) 08 March 2001 (08.03.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 341201/18422			
International application No. PCT/FR00/02377	International filing date (day/month/year) 25 August 2000 (25.08.00)	Priority date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)	
Applicant TRANSGENE S.A. etc			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived their requirement whereby this communication must take place by that date:
CA,EP,JP

Communication will take place only when requested by these Offices. Moreover, the applicant is not required to furnish a copy of the international application to the Offices in question (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
08 March 2001 (08.03.01) under No. WO 01/16344

REMINDER REGARDING CHAPTER 11 (Article 31.2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent international Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

8 March 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) International publication number

WO 01/16344 A1

(51) International patent classification⁷:

C12N 15/861, 5/10, 15/34, C07K 14/075, A61K 48/00

(21) International application number:

PCT/FR00/02377

(22) International filing date:

25 August 2000 (25.08.2000)

(25) Language of filing:

French

(26) Language of publication:

French

(30) Data relating to the priority:

99/10,859 27 August 1999 (27.08.1999)

FR

(71) Applicant (for all designated States except US):

TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): VAN RAAIJ, Mark,

Johan [NL/NL]; Looneind 3-B, NL-5131 RK Alphen Noord-Brabant (NL). CUSACK, Stephen [GB/FR]; 653, route de St. Nizier,

F-38170 Seyssinet (FR). LEGRAND, Valérie [FR/FR]; 33, rue de Ribeauvillé, F-67100 Strasbourg (FR). LEISSNER, Philippe [FR/FR]; 8, rue Humann, F-67000 Strasbourg (FR). MEHTALI, Majid [FR/NL]; Roffart 17, NL- 1083 CJ Amsterdam (NL).

(74) Representative: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Designated states (national): AU, CA, JP, US.

(84) Designated states (regional): European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Published:

- With the International Search Report.

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

As printed

WO 01/16344 A1

(54) Title: MODIFIED ADENOVIRAL FIBRE AND USES THEREOF

(54) Titre: FIBRE ADENOVIRALE MODIFIEE ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a modified adenoviral fibre comprising at least one mutation at the level of one or several residues included in the region of said fibre extending from layer A to layer B and including the loop AB.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet une fibre d'un adénovirus modifiée comprenant au moins une mutation au niveau d'un ou plusieurs résidus compris dans la région de ladite fibre s'étendant du feuillet A au feuillet B et incluant la boucle AB.